

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-131174  
(43)Date of publication of application : 20.05.1997

(51)Int.Cl. C12M 1/34  
// C12Q 1/04

(21)Application number : 08-252197 (71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD  
(22)Date of filing : 04.09.1996 (72)Inventor : ODA TOSHIHIKO  
TSUCHIYA MASAKAZU

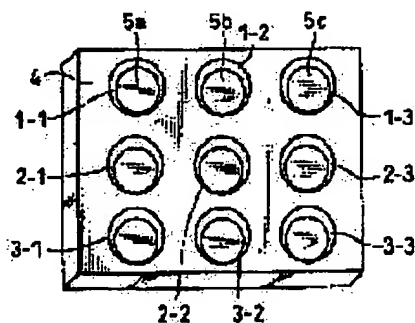
(30)Priority  
Priority number : 07256961 Priority date : 08.09.1995 Priority country : JP

## (54) PLATE FOR DETECTING MICROORGANISM

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject plate, capable of detecting a microorganism and simultaneously confirming the presence or absence of the deterioration in a reagent and judging the effectiveness of the judgment by forming plural wells for filling the reagent for detecting ingredients derived from the microorganism and wells for positive control and negative control as one set.

SOLUTION: This plate 4 for detecting a microorganism is obtained by preparing each of wells 1-1 to 1-3 for measuring a specimen comprising one or more reagent sheets 5, used for detection and located at the bottom thereof such as an endotoxin, a (1→3)β-D-glucan and a peptidoglycan as ingredients derived from a microorganism, each of wells 2-1 to 2-3 for positive control comprising the reagent sheets 5, used for detecting the ingredients derived from the microorganism and located at the bottom thereof and each of wells 3-1 to 3-3 for negative control comprising reagent sheets 5, used for detecting the ingredients, derived from the microorganism and located at the bottom thereof as one set and forming the one set or plural sets for each kind of the ingredients derived from the microorganism on the plate 4. The resultant plate is capable of visually judging the presence or absence of the microorganism.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-131174

(43)公開日 平成9年(1997)5月20日

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 1/34			C 1 2 M 1/34	B
// C 1 2 Q 1/04		7823-4B	C 1 2 Q 1/04	

審査請求、未請求 請求項の数9 FD (全7頁)

(21)出願番号 特願平8-252197  
(22)出願日 平成8年(1996)9月4日  
(31)優先権主張番号 特願平7-258961  
(32)優先日 平7(1995)9月8日  
(33)優先権主張国 日本(J P)

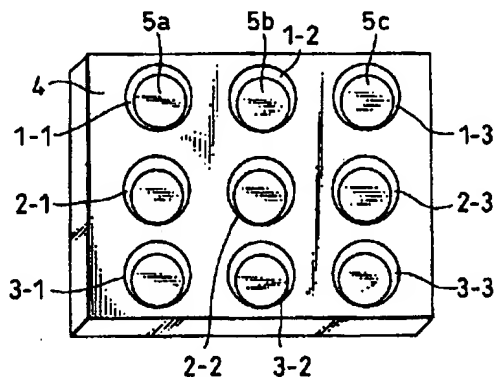
(71)出願人 000252300  
和光純薬工業株式会社  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号  
(72)発明者 織田 利彦  
大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
和光純薬工業株式会社内  
(72)発明者 土谷 正和  
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工  
業株式会社大阪研究所内  
(74)代理人 弁理士 稲垣 仁義

(54)【発明の名称】 微生物検出用プレート

(57)【要約】

【課題】検体中のグラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌等の微生物の検出と同時に、検出用試薬の劣化の有無及び検体希釈液による影響の有無を確認し、判定の有効性を判別できる微生物検出用プレートを提供する。

【解決手段】微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させた検体測定用ウェルと、前記微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させたポジティブコントロール用ウェル及び／又は前記微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させたネガティブコントロール用ウェルとを1組とし、これをプレート上に1組若しくは前記微生物由来成分の種類毎に複数組形成した。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させた検体測定用ウェルと、前記微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させたポジティブコントロール用ウェル及び／又は前記微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させたネガティブコントロール用ウェルとを1組とし、これをプレート上に1組若しくは前記微生物由来成分の種類毎に複数組形成させてなることを特徴とする目視にて微生物の有無を判別する微生物検出用プレート。

【請求項2】前記微生物由来成分検出用試薬を底部に保持させてなる請求項1に記載のプレート。

【請求項3】前記微生物由来成分の種類が、エンドトキシン、(1→3)β-D-グルカン及びペプチドグリカンの1種以上である請求項1または2に記載のプレート。

【請求項4】前記ウェルの組を、前記微生物由来成分としてエンドトキシン、(1→3)β-D-グルカン又はペプチドグリカン毎に、別々に形成してなる請求項3に記載のプレート。

【請求項5】前記検体測定用ウェルと、前記ポジティブコントロール用及び／又はネガティブコントロール用のウェルとを、前記微生物由来成分毎に同一列となるように形成し、且つ検体測定用、ポジティブコントロール用及び／又はネガティブコントロール用の用途毎に同一列となるように形成してなる請求項4に記載のプレート。

【請求項6】前記ポジティブコントロール用ウェルがポジティブコントロール液を添加するウェルであり、該ポジティブコントロール液は、前記微生物由来成分を含有する溶液である請求項1または5に記載のプレート。

【請求項7】前記ネガティブコントロール用ウェルがネガティブコントロール液を添加するウェルであり、該ネガティブコントロール液は、前記微生物由来成分を含有しない水若しくは検体希釈液である請求項1または5に記載のプレート。

【請求項8】前記微生物由来成分検出用試薬を担持させたシート状の吸収性担体又は前記微生物由来成分検出用試薬を含有させた水溶性高分子化合物のシート状物を、前記各々のウェル底部に保持した請求項2～7のいずれかに記載のプレート。

【請求項9】前記吸収性担体が、織布、不織布、濾紙若しくはスポンジ状の高分子化合物である請求項8に記載のプレート。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、例えばグラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌等の微生物を目視で検出するための微生物検出用プレートに係り、詳記すれば、検出用試薬の劣化の有無又は検体希釈液による影響の有無を確認し、判定の有効性を同時に判別できる微生物検出用プレートに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】エンドトキシン、(1→3)β-D-グルカン（以下、β-グルカンと略記する。）及びペプチドグリカン等は、各種微生物の細胞壁構成成分として知られている。微生物の細胞壁中のこれら成分の有無を調べることにより、検体中の真菌、グラム陰性菌、グラム陽性菌等の微生物種の有無をある程度確定し得ることは、従来から知られている。

【0003】従来、検体中のこれら微生物種の有無を確定する方法としては、エンドトキシン検出用試験紙を使用する方法（特開平6-341993号明細書参照）が知られていた。しかしながら、β-グルカン及びペプチドグリカンのようなエンドトキシン以外の微生物由来成分を検出することは、現実に行われていないし、知られてもいない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記従来のエンドトキシン検出用試験紙では、グラム陰性菌の有無を検出することはできるが、グラム陽性菌及び真菌等の微生物種の有無を検出することはできない。そればかりか、上記試験紙は、試験紙に含有させた検出用試薬の劣化や検体希釈液の影響等によって、発色しなかったり、誤って発色する場合もあるので、その判定結果は信頼性の点で十分満足すべきものではなかった。

【0005】この発明は、検体中のグラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌等の微生物の検出と同時に、検出用試薬の劣化の有無及び検体希釈液による影響の有無を確認し、判定の有効性を判別できる微生物検出用プレートを提供することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させた検体測定用ウェルと、前記微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させたポジティブコントロール用ウェル及び／又は前記微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させたネガティブコントロール用ウェルとを1組とし、これをプレート上に1組若しくは前記微生物由来成分の種類毎に複数組形成させてなることを特徴とする。

【0007】微生物由来成分検出用試薬を底部に位置させるということは、微生物由来成分検出用試薬若しくは該試薬含有物を、好ましくはフィルム状若しくはシート状とし、これを底部に保持させるか、或は単に底部に載置し、ウェル開口をフィルムで覆う等して、前記フィルム状若しくはシート状物等が開口から飛び出さないようにすることである。

## 【0008】

【発明の実施の形態】次に、本発明の実施の形態を図面に基いて説明する。図1に示すように、長方形の板状プレート4上には、3個の円形のウェル1、2、3が形成されている。尚、1は、微生物由来成分検出用試薬シ

ート5を底部に保持させた検体測定用ウェルであり、2は、同シート5を底部に保持させたポジティブコントロール用のウェルであり、3は、同シート5を底部に保持させたネガティブコントロール用のウェルである。

【0009】ウェル底部に位置させる微生物由来成分検出用試薬としては、エンドトキシン検出用試薬、 $\beta$ -グルカン検出用試薬及びペプチドグリカン検出用試薬が挙げられる。ポジティブコントロール用ウェル2には、ポジティブコントロール液を添加する。ポジティブコントロール液は、上記微生物由来成分の溶液、例えば上記微生物由来成分の精製品の水溶液である。従って、ポジティブコントロール液を添加すれば、当然着色する筈であり、着色しない場合は、微生物由来成分検出用試薬が劣化していると判断される。尚、ここでいう精製品とは、目的の微生物由来成分以外には、ウェル中の微生物由来成分検出用試薬と反応する成分を含まないものを言う。また、その精製方法は特に限定されず、この分野で通常利用される方法は全て利用可能である。

【0010】ネガティブコントロール用のウェル3には、ネガティブコントロール液を添加する。ネガティブコントロール液は、通常注射用水のような微生物由来成分を含有しない水或は微生物由来成分を含有しない検体希釈液を使用する。従って、ネガティブコントロール液を添加しても、着色しない筈であり、着色した場合は、微生物由来成分検出用試薬が劣化していると判断される。また、ネガティブコントロール液として、検体希釈液を使用して着色した場合は、微生物由来成分検出用試薬が劣化しているか、検体希釈液中に検出用試薬を着色させる不純物が混入していると判断される。

【0011】ポジティブコントロール用のウェル2とネガティブコントロール用のウェル3とは、いずれか一方でも良いが、判定の信頼性を十分確保するには、両方設けるのが好ましい。ポジティブコントロール用及びネガティブコントロール用の微生物由来成分検出用試薬は、対応する検体測定用で使用した微生物由来成分検出用試薬と同じものを使用する。例えば、検体測定用ウェルにエンドトキシン検出用試薬を保持させた場合は、それに対応するポジティブコントロール用のウェル2とネガティブコントロール用のウェル3にも、エンドトキシン検出用試薬を保持させる。

【0012】上記実施例では、ウェル1、2、3は円形に形成されているが、これは必ずしもこのようでもなくとも良く、他の形状であっても差し支えない。図2は、本発明の他の実施例を示すものであり、四角形の板状プレート4に、エンドトキシン検出用ウェル1-1、2-1、3-1、 $\beta$ -グルカン検出用ウェル1-2、2-2、3-2及びペプチドグリカン検出用ウェル1-3、2-3、3-3の合計9個の円形の凹状ウェルが形成されている。尚、1-1、1-2、1-3は、検体用ウェル、2-1、2-2、2-3は、ポジティブコントロ

ル用ウェル、3-1、3-2、3-3は、ネガティブコントロール用ウェルである。

【0013】エンドトキシン検出用ウェル1-1、2-1、3-1の底部には、エンドトキシン検出用試薬シート5aが保持され、 $\beta$ -グルカン検出用ウェル1-2、2-2、3-2の底部には、 $\beta$ -グルカン検出用試薬シート5bが保持され、ペプチドグリカン検出用ウェル1-3、2-3、3-3の底部には、ペプチドグリカン検出用試薬シート5cが保持されている。

【0014】上記実施例では、検体用ウェル1-1、1-2、1-3、ポジティブコントロール用ウェル2-1、2-2、2-3及びネガティブコントロール用ウェル3-1、3-2、3-3は、それぞれ用途毎に同一列となるように形成され、エンドトキシン検出用ウェル1-1、2-1、3-1、 $\beta$ -グルカン検出用ウェル1-2、2-2、3-2及びペプチドグリカン検出用ウェル1-3、2-3、3-3は、微生物由来成分毎に同一列となるように形成されている。このように形成することによって、実験操作とその判別を容易に間違えずに行うことができる。

【0015】板状プレート4としては、検出用試薬等と反応しないプラスチック等の適当な材料から形成することができる。板状プレート4は、上面にウェルが形成できるものであれば良く、その形状は特に限定されない。また、判定のし易さから、白色プレート又は透明板の底面を白色にしたプレートを使用するのが好ましい。上記実施例では、1枚の板状プレート4に9個のウェルを形成しているが、エンドトキシン、 $\beta$ -グルカン及びペプチドグリカン検出用ウェル毎に別の板状プレートに形成し、これらプレートを合わせてあるいは別々に使用するようにしても良い。

【0016】ウェル底部に所定の検出用試薬を保持させる方法としては、これら試薬を、検体を加えたときに反応し得る状態でウェル底部に保持させることができれば良く、特に限定されない。例えば、これら検出用試薬をシート状の吸収性担体に担持させたものを調製し、これを該ウェル底部に保持させる方法、これら検出用試薬を水溶性で且つ被膜形成能を有する高分子化合物を用いてフィルム状（シート状）としたものを調製し、これを該ウェル底部に保持させる方法等が好ましい。

【0017】上記検出用試薬を担持させる吸収性担体としては、例えばポリプロピレン、ポリエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ナイロン、ポリエチレン、ポリ酢酸ビニル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン等のプラスチック、ガラス繊維、セルロース、例えばメチルセルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース等のセルロース誘導体等を素材とする吸収性担体（より具体的には、例えば、織布、不織布、濾紙、スポンジ等）が挙げられる。

【0018】また、水溶性で被膜形成能を有する高分子

化合物としては、例えばポリビニルアルコール、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース等のセルロース誘導体、例えばポリアクリル酸、ポリメタクリル酸等のポリカルボン酸等が挙げられる。

【0019】また、これら検出用試薬を吸収性担体に担持させるには、例えば吸収性担体に、検出用試薬溶液を含浸させた後に乾燥させる等の公知の方法によって行えば良い。それぞれの検出用試薬を担持させた吸収性担体或はフィルムをウェル底部に保持させる方法としては、例えば、これらをウェル形状に合わせて切り出し、ウェル底部に接着させるか密着圧入保持させる方法、これらをウェルが貫通状態で形成された板状物と当該ウェルが形成されていない板状物との間に挟み込んで接着させる方法等が挙げられる。

【0020】本発明の微生物検出用プレートのウェル底部に担持させるエンドトキシン検出用試薬としては、例えばリムルス属(Limulus)、タキプレウス属(Tachypleus)、或はカルシノスコルピウス属(Calinoscorpius)に属するカブトガニの血球成分を含んでいるような試薬、所謂リムルス試薬であってβ-グルカンとは反応しない性質を有する試薬等が挙げられる。尚、本発明に於いては、目視によりエンドトキシンを検出するため、このような試薬は、エンドトキシンの存在により着色するような合成基質法用試薬が好ましい。また、このような条件を満たす市販の試薬、例えばバイオウイタカー社(BioWhittaker Inc.)、エンドセーフ社(Endosafe, Inc.)、生化学工業(株)及び和光純薬工業(株)等から市販されているものであって、エンドトキシンに特異的な試薬は、当然のことながら本発明の目的のために使用可能である。

【0021】β-グルカン検出用試薬としては、例えば昆虫の体液成分から調製されたβ-グルカンと特異的に反応する試薬や、例えばリムルス属(Limulus)、タキプレウス属(Tachypleus)、或はカルシノスコルピウス属(Calinoscorpius)に属するカブトガニの血球成分を含みβ-グルカンとは反応するがエンドトキシンとは反応しない性質を有する試薬であって、目視にてβ-グルカンの存在を確認できる試薬(例えば合成基質を用いる試薬など)が挙げられる。これら試薬は、市販されているものを適宜使用しても良いし、また公知の方法により自製したものを使用しても良い。

【0022】ペプチドグリカン検出用試薬としては、例えば昆虫の体液成分から調製されたペプチドグリカンに対して特異的な試薬などが挙げられ、市販されているものを適宜使用しても良いし、また公知の方法により自製したものを使用しても良い。

【0023】昆虫の体液成分からβ-グルカン検出用試薬又はペプチドグリカン検出用試薬を調製する方法としては、例えば、β-グルカン検出用試薬については、特

開昭63-141598号公報、ペプチドグリカン検出用試薬については、特開昭63-141599号公報に示されているような方法が挙げられる。

【0024】次に、本発明の微生物の検出用プレートを使用して、微生物の存否の判定を行った例を示す。検体(1)～(6)について、微生物の存否とその種類の判定を行った。使用した本発明の微生物検出用プレートは、図2に示す形態のものであり、以下の操作により判定を行った。

10 【0025】即ち、微生物検出用プレートの検体用ウェル1-1、1-2、1-3には、所定の検体を、また、ポジティブコントロール用ウェル2-1、2-2、2-3及びネガティブコントロール用ウェル3-1、3-2、3-3には、所定のコントロール液を夫々一定量滴下し、反応開始後所定時間経過後に、夫々のウェルに於ける発色状況を目視により判定して、微生物の存否とその種類を判定した。

20 【0026】各ウェルにおける発色状況からの判定は、ポジティブコントロールが陰性の場合と、ネガティブコントロールが陽性の場合を除いて、次のようにして行った。尚、ポジティブコントロールが陰性の場合とネガティブコントロールが陽性の場合には、無効と判断する。

- ・エンドトキシン、β-グルカン及びペプチドグリカンのいずれもが陰性の場合：微生物が存在しないと判定。
- ・β-グルカンのみ陽性の場合：真菌が存在すると判定。

- ・ペプチドグリカンのみ陽性の場合：グラム陽性菌が存在すると判定。

30 【0027】・エンドトキシンとペプチドグリカンの両方が陽性の場合：グラム陰性菌のみ、あるいはグラム陰性菌とグラム陽性菌の両方が存在すると判定。

- ・β-グルカンとペプチドグリカンの両方が陽性の場合：グラム陽性菌と真菌の両方が存在すると判定。

- ・エンドトキシン、β-グルカン及びペプチドグリカンの三者が陽性の場合：グラム陰性菌と真菌の両方が存在する、あるいはグラム陰性菌とグラム陽性菌と真菌の三者が存在すると判定。

40 【0028】次表1～2に、検体(1)～(6)の各ウェルにおける発色状況からの判定結果を示した。尚、表1～2中、+は発色していることを示し、-は発色していないことを示す。また略号は、それぞれ以下の意味を表す。

S：検体

PC：ポジティブコントロール

NC：ネガティブコントロール

ET：エンドトキシン

GL：β-グルカン

PG：ペプチドグリカン

【0029】

50 【表1】

検体	検出結果	判定
(1)	ET GL PG	微生物なし。
	S - - -	
	PC + + +	
	NC - - -	
(2)	ET GL PG	真菌が存在する。
	S - + -	
	PC + + +	
	NC - - -	
(3)	ET GL PG	グラム陽性菌が存在する。
	S - - +	
	PC + + +	
	NC - - -	
(4)	ET GL PG	グラム陰性菌 あるいは 陽性菌と陰性菌 が存在する。
	S + - +	
	PC + + +	
	NC - - -	

【0030】

\* \* 【表2】

検体	検出結果	判定
(1)	ET GL PG	グラム陽性菌 と真菌が存在 する。
	S - + +	
	PC + + +	
	NC - - -	
(2)	ET GL PG	グラム陰性菌と 真菌あるいは 陰性菌と陽性菌 と真菌が存在す る。
	S + + +	
	PC + + +	
	NC - - -	

【0031】次に、本発明のプレートを用いた微生物の  
検出結果を無効と判断すべき場合の例を次表3に示す。  
尚、表3中の各記号は、表1～2と同じ意味を表す。

【0032】

【表3】

検出結果	判定	備考																
<table><tr><td></td><td>ET</td><td>GL</td><td>PG</td></tr><tr><td>S</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>PC</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td>NC</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>		ET	GL	PG	S	+	-	-	PC	+	+	+	NC	-	-	-	無効	グラム陰性菌が存在すればペプチドグリカンも検出されなければならない。
	ET	GL	PG															
S	+	-	-															
PC	+	+	+															
NC	-	-	-															
<table><tr><td></td><td>ET</td><td>GL</td><td>PG</td></tr><tr><td>S</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td></tr><tr><td>PC</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td>NC</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>		ET	GL	PG	S	+	+	-	PC	+	+	+	NC	-	-	-	無効	グラム陰性菌が存在すればペプチドグリカンも検出されなければならない。
	ET	GL	PG															
S	+	+	-															
PC	+	+	+															
NC	-	-	-															
<table><tr><td></td><td>ET</td><td>GL</td><td>PG</td></tr><tr><td>S</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td></tr><tr><td>PC</td><td>-</td><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td>NC</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>		ET	GL	PG	S	-	+	-	PC	-	+	+	NC	-	-	-	無効	ポジティブコントロールが陰性の場合は無効。
	ET	GL	PG															
S	-	+	-															
PC	-	+	+															
NC	-	-	-															
<table><tr><td></td><td>ET</td><td>GL</td><td>PC</td></tr><tr><td>S</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td></tr><tr><td>PC</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td>NC</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>		ET	GL	PC	S	-	+	-	PC	+	+	+	NC	+	-	-	無効	ネガティブコントロールが陽性の場合は無効。
	ET	GL	PC															
S	-	+	-															
PC	+	+	+															
NC	+	-	-															

【0033】表3に示したような検出結果が得られた場合は、その結果は信頼性に欠けるので、その検体について再検討を行う必要がある。

【0034】

【発明の効果】本発明によれば、研究室等で、検体中の真菌、グラム陰性菌、グラム陽性菌等の微生物の存否とその種類の判定を、一次スクリーニング的に定性的に行うことができると共に、検体についての陽性または陰性の判別と同時に、検出用試薬の劣化の有無又は検体希釈液による検出反応への影響の有無を確認し、判定の有効性を確認できるので、目視判定の精度を著しく高めることができる。

【0035】また、実験操作は、各ウエルに所定溶液を一定量添加するだけであるので、簡単であるほか、各ウエルは、隔壁により隔てられているので、他のウエルに添

\* 加される溶液により汚染されることなく正確に測定できる。

【0036】

【図面の簡単な説明】

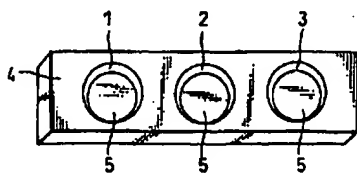
【図1】本発明の実施例を示す斜視図である。

【図2】本発明の他の実施例を示す斜視図である。

【符号の説明】

- |                  |                 |
|------------------|-----------------|
| 1, 1-1, 1-2, 1-3 | 検体測定用ウエル        |
| 2, 2-1, 2-2, 2-3 | ポジティブコントロール用ウエル |
| 3, 3-1, 3-2, 3-3 | ネガティブコントロール用ウエル |
| 4                | 板状プレート          |
| 5, 5a, 5b, 5C    | 微生物由来成分検出用試薬シート |

【図1】



(7)

特開平9-131174

【図2】

